

## キヌレニン代謝産物のプロインスリン 生合成に及ぼす影響

—ラット膵分離ラ氏島を用いた *in vitro* 実験—

金沢大学医学部第一内科学教室 (主任：服部 信教授)

能 登 裕

(昭和55年2月9日受付)

本論文の要旨の一部は第49回日本生化学会シンポジウム, 第9回国際糖尿病学会において発表した。

トリプトファン-Niacin代謝系路の主要な分岐点に位置するキヌレニンはNAD生成へ向かう経路以外に、キノリン核を持つキヌレン酸、キナルジン酸、キサントレン酸あるいは8-オキシキナルジン酸へ代謝される経路を持っている(図1)。

近年種々の病態において、キヌレン酸やキサントレン酸などキヌレニン代謝産物が体内で過剰に生成されていることを示唆する報告がある<sup>1)-3)</sup>。たとえば、ステロイド投与患者<sup>12)</sup>、経口避妊薬服用者<sup>34)</sup>、妊婦<sup>5)</sup>あるいは甲状腺機能亢進ラット<sup>6)</sup>などでキヌレン酸やキサントレン酸の尿中排泄量が、トリプトファン経口負荷後、正常対照に比較して著しく増加することが知られている。

このようなキヌレニン代謝異常は生体に何らかの影響を与えてはいないだろうか？これまでキナルジン酸をはじめとするキノリン核を有するキヌレニン代謝産物の生理活性についてほとんど明らかにされていない。しかし、上述したキヌレニン代謝産物が尿中に異常に増加する状態では、しばしば糖尿病状態あるいは高インスリン血症の合併が観察されている<sup>7)-10)</sup>。また古武ら<sup>11)</sup>はウサギを用いた *in vivo* 実験で、キサントレン酸に催糖尿病作用のあることを報告している。さらに、糖尿病患者のキヌレン酸やキサントレン酸などキヌレニン代謝産物の尿中排泄量は正常人にくらべ明らかに増加しており<sup>12)13)</sup>、しかも重症であるほどその排泄量が多いという報告がある<sup>14)</sup>。これらの事実はキヌレニン代謝と糖代謝あるいは糖尿病との間に密接な関係が存在する可能性を示唆するものであるが、今までこ

の関連性について病態生化学的見地から考察した報告はなかった。

しかし最近岡本ら<sup>15)</sup>は、ラット膵より分離したランゲルハンス氏島(以下ラ氏島と略す)を用いて、キナルジン酸や8-オキシキナルジン酸などのキヌレニン代謝産物が低濃度ブドウ糖存在下でインスリン分泌促進作用を持つことを見いだした。さらに岡本ら<sup>16)</sup>は、これら代謝産物が高濃度ブドウ糖によるインスリン分泌作用を逆に抑制することをも明らかにした。またこれらを支持する結果はラットの *in vivo* 実験でも観察されている<sup>17)</sup>。以上の成績はキヌレニン代謝が直接インスリン分泌を介して糖代謝に関与する可能性を示すものであり、またキヌレニン代謝産物の過剰生成がある種の糖尿病状態の成因に重要な役割を演じている可能性を推定させた<sup>17)</sup>。

本研究はこのような考えに基づき、キヌレニン代謝産物の糖代謝に与える影響を検討することの一環として、キヌレニン代謝産物のプロインスリン生合成に対する作用について検索したものである。いくつかの新しい知見を得たので以下に報告する。

### 材料および方法

#### I. 実験動物

オリエンタル固形飼料MFにて飼育した体重250～300gのWistar系雄性ラットを用いた。

#### II. 膵ラ氏島分離法

一晚絶食させたラットをペントバルビタール(50 mg/kg、腹腔内)麻酔下に開腹し、Lacyらのコラゲナー

Inhibition by Kynurenine Metabolites of Proinsulin Biosynthesis in Isolated Pancreatic Islets of the Rat. Yutaka Noto, First Department of Internal Medicine (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

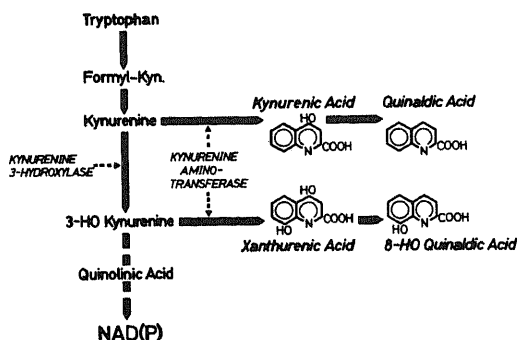


図1 哺乳動物におけるキヌレニンおよびその代謝産物の生成過程

消化法<sup>18)</sup>に改良を加えた Okamoto らの方法<sup>19)</sup>に従って、きわめて温和な条件下で豚ラ氏島を処理し分離した。すなわち、総胆管を十二指腸開口部で結紮後、左右肝管の合流部付近から十二指腸開口部へ向けて21ないし23ゲージの翼状針を総胆管に挿入した。この翼状針を通して0.6%ブドウ糖を含むハンス氏液を約20ml注入し、膵外分泌組織を膨化させた。ついでこの膨化膵を十二指腸や胃などの周囲組織から分離し摘出した。摘出膵は約2~3mmの大きさに細切し、30mgのコラゲナーゼ (CLS IV, 160U/mg, Worthington Biochemical Corp., Freehold/N.J.) と100mgの牛血清アルブミン (Sigma, 以下BSAと略記) とを含む5mlのハンス氏液と共に20ml容三角フラスコに入れ、37℃の恒温水槽中で10分間激しく振盪 (150~200回/分) して膵切片をコラゲナーゼで処理した。消化した膵組織は沈殿法<sup>18)</sup>に準じてハンス氏液で数回洗浄、沈殿を繰り返す、最後に実体顕微鏡下で毛細管ピペットを用いて沈殿物中よりラ氏島を採取した。

### III. インキュベーション法

15個の分離ラ氏島を50μlのインキュベーションメジウムを含む先細りガラス遠心管に入れ、O<sub>2</sub>95%-CO<sub>2</sub>5%混合ガス通気下で一定時間インキュベートした<sup>20)</sup>。インキュベーションメジウムには5mM ビルビン酸ナトリウム、5mM フマル酸ナトリウム、5mM グルタミン酸ナトリウム、2% BSA および5μCi-[4,5-<sup>3</sup>H] leucine (5.0Ci/mmole, New England Nuclear Corp.) を含む Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。このメジウムに3.3mM あるいは20mM ブドウ糖を単独もしくは種々の濃度のキヌレニン代謝産物と共に添加して、(プロ)インスリン生成への影響を検討した。プロインスリンからインスリンへの転換をみる実験では、[<sup>3</sup>H]-leucine と20mM ブドウ糖を含むメジウム中でラ氏島を60分間インキ

ュベートして前もってプロインスリンを標識した後 ("pulse"), free の [<sup>3</sup>H]-leucine を除去し、次いでブドウ糖および [<sup>3</sup>H]-leucine 無添加の条件下でキヌレニン代謝産物を加えて、さらに60分間ないし120分間インキュベートした ("chase")。

### IV. ラ氏島蛋白抽出法

インキュベーション終了後、速やかに氷冷した2mlのハンス氏液をインキュベーションメジウムに加えて反応を停止させ、4℃ 2000×gで1分間遠心し上清を除去した。次いでラ氏島を氷冷した3mlのハンス氏液で2回洗浄後、25μg/ml濃度の Trasylol (Bayer Japan, Ltd.) を含む0.7mlの蒸留水に再浮遊した。これを Kontes Micro-Ultrasonic Cell Disrupter (Vineland/N.J., U.S.A.) を用いて、水で冷しながら30秒間超音波処理した。この超音波処理したラ氏島浮遊液に "carrier" として1mgの牛プロインスリン (Novo Industri, Copenhagen) あるいはラットインスリン (Novo Industri, Copenhagen) を添加し、さらに0.3mlの25%トリクロル酢酸 (和光純薬) を加えて "carrier" と共にラ氏島蛋白を沈殿させた。これを4℃にて一晩静置後、2000×g, 4℃で5分間遠心し上清を除去し、沈殿物を一度エーテルで洗浄した。この沈殿物に0.5mlの1M酢酸を加えて蛋白を抽出し、酢酸に不溶の残余物は4℃, 12000×gで15分間遠心し除去した。

### V. Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィー

上記の如く処理して得られた酢酸抽出液を Sephadex G-50 (fine, Pharmacia, Sweden) カラム (1×90cm) に添加した。溶出には1M酢酸を用い、室温で各フラクション1.2mlずつ分画し、溶出は10ml/hrの速度で行なった。溶出中は吸光度275nmで連続モニターし "carrier" のプロインスリンあるいはインスリンの溶出部位を決定した。分画に用いた試験管は蛋白を定量的に回収するため、50%酢酸1ml当たり10mgの割合で溶解したBSAであらかじめcoatingした<sup>20)</sup>。分画採取した溶出液の0.5mlを液体シンチレーション用調整液<sup>21)</sup> (5.5gPOP; 0.1gPOPOP; 333ml Triton X-100; 667ml toluene; いずれも和光純薬) 5mlと共に計測用バイアルびんに入れ、放射活性を測定した。

### VI. ゲルクロマトグラフィーにおけるインスリン、プロインスリンの同定

ゲルクロマトグラフィーにおける放射活性ピークのインスリン、プロインスリンの同定は、牛プロインスリンやラットインスリンとのcochromatography法、Permuttらの方法<sup>22)</sup>によるモルモット抗インスリ

ン抗体 (Miles Laboratories, Inc., Kankakee/Ill., U. S. A.) および羊抗モルモット  $\gamma$ -グロブリン血清 (Miles Laboratories, Inc.) を用いた免疫沈降法, さらには Davis らの方法<sup>23)</sup>に準じたポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (pH 8.6, 15 % gel) により行なった。

## Ⅶ. 試薬その他

特に付記してない試薬は全て市販の分析用 (和光純薬, 特級) を使用した。

結果についての統計的処理には Student の *t* 検定を用いた。

## 成 績

### Ⅰ. ゲルクロマトグラフィーにおける放射活性ピークの固定

図2は20mM ブドウ糖存在下で [ $^3\text{H}$ ] -leucine と共にラ氏島を種々の時間インキュベートした時のラ氏島抽出物の Sephadex G-50 によるゲルクロマトグラフィーの溶出パターンを示す。同時に cochromatograph した BSA (=  $V_0$ ), 牛プロインスリン, ラットインスリンの溶出部位も示した。

図から明らかなように, 3つの放射活性ピークが得られた。第1のピークは void volume ( $V_0$ ) に一致し, BSA と共に溶出されたが, このピークは抗インスリン抗体とはほとんど反応せず, プロインスリンやインスリン以外のラ氏島蛋白であると考えられた。第2の放射活性ピーク (分画 26 ~ 32) は marker として添加した牛プロインスリンの溶出部位に一致し, 第3のピーク (分画 33 ~ 39) はラットインスリンの溶出部位に一致した。これら第2, 第3のピークはいずれも抗インスリン抗体と強く反応した。さらに第2, 第3の放射活性ピークが, それぞれ [ $^3\text{H}$ ] -プロインスリン, [ $^3\text{H}$ ] -インスリンであることをポリアクリルアミドゲル電気泳動 (pH 8.6, 15 % gel)<sup>23)</sup> により確認した。

(プロ)インスリンの生合成過程を時間の経過とともに検討してみると (図2), インキュベーション開始後60分までは, 大部分の放射活性は  $V_0$  画分およびプロインスリン画分に取り込まれた。2時間半から4時間のインキュベーションでは, 時間の経過と共にインスリン画分にも放射活性ピークが出現し始め次第に放射活性は増加した。プロインスリン画分の放射活性は2時間半のインキュベーションではほぼ plateau に達したが, これはプロインスリン生合成速度と, プロインスリンからインスリンへの転換速度との間に定常状態 (steady state) の成立したことによる<sup>24)</sup>と思われる。この生合成過程の時間的経過は Steiner らの結果<sup>20)</sup>にほぼ一致した。

以下にプロインスリンやインスリン以外のラ氏島蛋白を "non-insulin" 蛋白としてまとめて取り扱うが, この "non-insulin" 蛋白への [ $^3\text{H}$ ] -leucine の取り込みは, 便宜上実験方法Ⅳで述べた1M 酢酸不溶の残余物 ( $12000 \times \text{g}$ , 15 分間遠心沈殿物) の放射活性と  $V_0$  画分の放射活性とから算出した。

### Ⅱ. [ $^3\text{H}$ ] -leucine のプロインスリンへの取り込み に及ぼすキナルジン酸の影響

ラ氏島を 20mM ブドウ糖の存在下で 60 分間インキュベートすると, 放射活性の大部分は  $V_0$  画分およびプロインスリン画分にのみ出現することを既に述べた (図2)。そこでこの実験条件下に種々の濃度のキナルジン酸を加え, 20mM ブドウ糖によるプロインスリン生合成に与えるキナルジン酸の影響を検討した。図3に 20mM ブドウ糖および種々の濃度のキナルジン酸を添加した時のプロインスリン画分及び "non-insulin" 蛋白へ取り込まれる放射活性を示した。20mM ブドウ糖単独の場合を 100 % として表現した。

0.5mM キナルジン酸の添加によりプロインスリン生合成はキナルジン酸無添加時の 70 % と有意に ( $n = 4$ ;  $P < 0.05$ ) 抑制された。キナルジン酸濃度が 1.0mM および 2.0mM に増加すると, プロインスリン

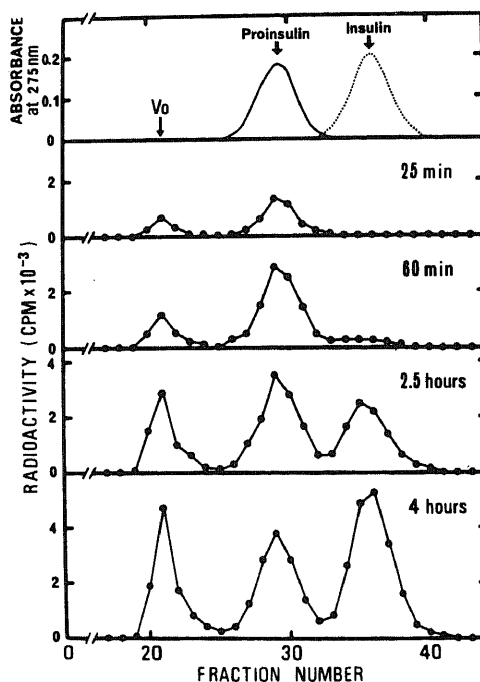


図2 プロインスリンおよびインスリン生合成の時間経過

画分への取り込みがさらに抑制され、それぞれ対照の52%および38%に減少した ( $n=4$ ;  $P<0.01$ )。一方、これらの濃度のキナルジン酸は“non-insulin”蛋白への放射活性の取り込みには有意な影響を及ぼさなかった。さらに高濃度 (3mM~8mM) のキナルジン酸存在下では、プロインスリン画分のみならず“non-insulin”蛋白への放射活性の取り込みも有意に ( $n=4$ ;  $P<0.05\sim0.01$ ) 阻害されたが、プロインスリン画分への取り込みがより強く抑制される傾向にあった。

### Ⅲ. プロインスリン生成に及ぼす種々トリプトファン代謝産物の影響

プロインスリン生成に与える種々のトリプトファン代謝産物の効果を表1にまとめた。これらの代謝産

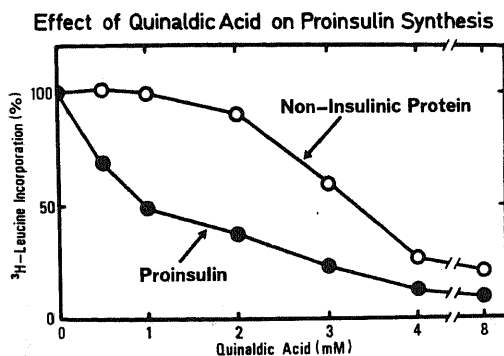


図3 キナルジン酸のプロインスリン生成に及ぼす影響

物はいずれも1.0mMの濃度でメジウムに添加し、20mMブドウ糖と共に60分間ラ氏島をインキュベートした。20mMブドウ糖のみの場合を100%とすると、8-オキシキナルジン酸はキナルジン酸と同様にプロインスリン生成を著明に抑制し、プロインスリン画分への放射活性の取り込みは31%に減少した ( $n=4$ ;  $P<0.01$ )。またキサンツレン酸やキヌレン酸もプロインスリン生成を対照の75%および79%に抑制した ( $n=8$ ;  $P<0.05$ )。しかしこれらの代謝産物はいずれも“non-insulin”蛋白への放射活性の取り込みに影響を与えなかった。L-トリプトファンやL-キヌレンはプロインスリン生成を阻害する傾向にあったが有意ではなく ( $n=10$ ;  $P>0.05$ )。3-オキシアントラニル酸やキノリン酸は全く影響を与えなかった。

### Ⅳ. プロインスリンからインスリンへの転換に及ぼすキナルジン酸の影響

20mMブドウ糖と種々の濃度のキナルジン酸存在下で、ラ氏島を4時間インキュベートした時のラ氏島抽出物の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーによる溶出パターンを図4に示した。図から明らかなように、キナルジン酸濃度の増加とともに、プロインスリンおよびインスリン画分への放射活性の取り込みはいずれも容量反応的に阻害された。しかし各キナルジン酸濃度におけるプロインスリン画分の放射活性とインスリン画分のそれとの比(P:I)は20mMブドウ糖単独の時のP:Iにくらべて明らかな差がなかった。この成績はプロインスリンからインスリンへの転換にキナル

表1. プロインスリン生成に及ぼす種々トリプトファン代謝産物の影響

Addition (1mM)	[ <sup>3</sup> H]-Leucine Incorporation (%)	
	Proinsulin	Non-insulin Protein
20mM Glucose	100	100
+ Quinaldic acid	42±3**	97±6
+ 8-Hydroxyquinaldic acid	31±4**	90±8
+ Xanthurenic acid	75±3*	98±9
+ Kynurenic acid	79±5*	102±14
+ L-Tryptophan	88±12	89±9
+ L-Kynurenine	90±10	92±7
+ 3-Hydroxyanthranilic acid	106±12	102±7
+ Quinolinic acid	101±8	98±13

\*\*  $p<0.01$ , vs. 20mM glucose alone, \*  $p<0.05$ , vs. 20mM glucose alone. Islets were incubated with [<sup>3</sup>H] leucine for 60 min in the presence of 20mM glucose and 1mM tryptophan metabolites as indicated. The results are expressed in percent of the corresponding total radioactivity of the control without tryptophan metabolite.

ジン酸が影響を与えないことを示唆するが、このことはさらに次の pulse-chase 実験からも確かめられた。

すなわち、図5の上段に示すように、20mM ブドウ糖存在下でラ氏島を60分間インキュベートすると $[^3\text{H}]$ -leucineの放射活性はプロインスリン画分にのみ取り込まれた(pulse)。このラ氏島からfreeの $[^3\text{H}]$ -leucineを除去し、ブドウ糖無添加の条件下でさらに60分間あるいは120分間インキュベートする(chase)と、図5中段の点線および実線で示されるように、プロインスリン画分の放射活性のそれぞれ約50%および75%がインスリン画分へ移った。これはプロインスリンからインスリンへの転換が行なわれたこと

を示す。またプロインスリンからインスリンへの転換の half-time が約1時間であることは、Steiner らの結果<sup>20)</sup>と一致した。

そこで、この実験条件下で、pulse インキュベーション後に3mMのキナルジン酸を添加し、転換に及ぼすキナルジン酸の影響を調べた。図5下段に示すように、ゲルクロマトグラフィーによる放射活性の溶出パターンは中段のコントロールの場合と明らかな差がなかった。この結果からもキナルジン酸はプロインスリンからインスリンへの転換に影響を与えないことが示唆された。

## 考 察

本研究では $[^3\text{H}]$ -leucineのプロインスリン画分およびインスリン画分への取り込みを(プロ)インスリン生合成の指標として、キヌレニン代謝産物のプロインスリン生合成に与える影響を検討した。今回の実験成績から、キナルジン酸や8-オキシキナルジン酸などのキノリン核を持つキヌレニン代謝産物がラット脳分離ラ氏島のプロインスリン生合成を著明に阻害することが示された(表1)。しかもこのプロインスリン生合成阻害作用は他のラ氏島蛋白、つまり“non-insulin”蛋白に対する作用と比較して明らかに特異的であった(表1; 図3)。たとえば0.5mMキナルジン酸存在下では、すでにプロインスリン画分への $[^3\text{H}]$ -leucineの取り込みが有意に抑制されるのに対し、“non-insulin”蛋白画分への取り込みは何ら影響を受けなかった。

今回の成績からキヌレニン代謝産物のプロインスリン生合成阻害作用の機序に関して一定の結論を導くことは困難である。しかし、いくつかの可能性を考えることができる。第一にこれらの物質がラ氏島B細胞のleucineのプール(pool)に変化を与えたり、取り込みを抑制したりする可能性である。しかし他のラ氏島蛋白生合成に比べ、プロインスリン生合成がより選択的に阻害される事実から考えて、この可能性は少ないと思われる。第二の可能性は、これらキヌレニン代謝産物がラ氏島B細胞内のATP濃度を低下させることによるのではないかということである。Hansonら<sup>25)</sup>はラット肝より分離したミトコンドリアを用いて、キナルジン酸がピルビン酸の酸化を阻害することを報告している。しかし、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を抑制する作用を持つことが知られている<sup>26)</sup>3-オキシアントラニール酸が、少なくとも今回の実験条件下でプロインスリン生合成を阻害しなかったこと(表1)や、2,4-dinitrophenol存在下では

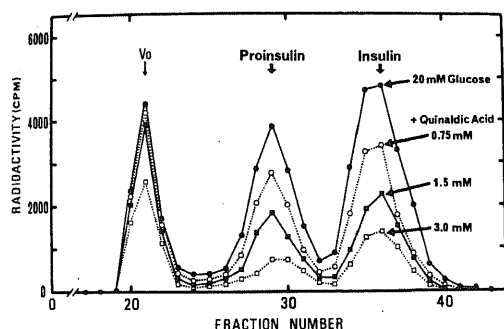


図4 種々の濃度のキナルジン酸の(プロ)インスリン生合成に与える影響

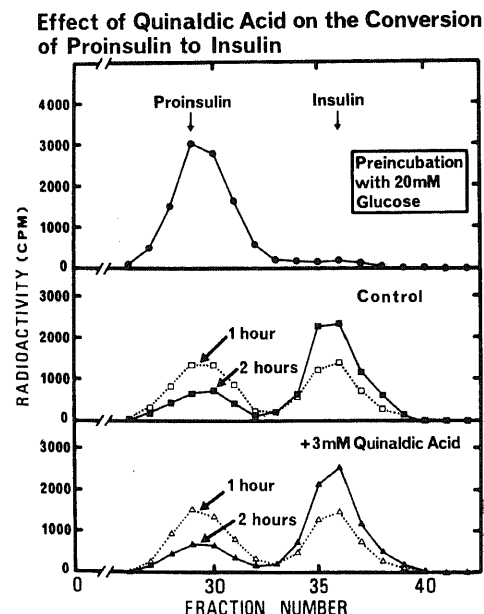


図5 プロインスリンからインスリンへの転換に及ぼすキナルジン酸の影響

プロインスリン生合成の選択的阻害が認められず、ラ氏島蛋白全般の生合成が一様に抑制されることが報告されていること<sup>22)</sup>などから、今回の実験成績をラ氏島内 ATP 濃度の低下のみで説明することはできないと思われる。

プロインスリンからインスリンへの転換はエネルギーに依存せず、その half-time は約 60 分とされるが<sup>24)</sup>、今回の実験結果も図 5 中段で示されるように、ほぼそれに一致した。そして [<sup>3</sup>H]-leucine による pulse-chase 実験 (図 5) や 4 時間のインキュベーションによる static な実験 (図 4) のいずれの結果から、キナルジン酸はプロインスリンからインスリンへの転換過程に明らかな影響を与えないことが示された。したがってキナルジン酸の作用部位はプロインスリンからインスリンへの転換過程よりも前の段階で、かつ leucine の B 細胞へ取り込まれてから以降の段階に存在すると考えられた。

トリプトファン代謝産物のなかで、プロインスリン生合成阻害作用は 8-オキシキナルジン酸やキナルジン酸において最も著明であり、キサントレン酸やキヌレン酸の阻害作用がそれに次いだ (表 1)。これら 4 つの代謝産物はいずれもその構造式の中にキノリン核を有している。一方、キノリン核を持たない L-トリプトファン、L-キヌレニンあるいは 3-オキシアントラニル酸にはプロインスリン生合成阻害作用を認めることができなかった。この事実はプロインスリン生合成阻害効果にキノリン核が重要な役割を果たしていることを推測させ興味深いと思われる。これまでキノリン核を有する物質と膵 B 細胞との間に密接な関係が存在することを示唆する成績がいくつか報告されている。岡本は<sup>25)</sup>ウサギに Oxine (8-oxyquinoline) を静脈内投与し、実験的糖尿病を発生させた。また古武ら<sup>13)</sup>はラットに生体代謝産物であるキサントレン酸を投与することにより高血糖の出現を観察し、この物質に催糖尿病作用 (diabetogenic action) のあることを報告している。さらに武内は<sup>26)</sup>キノリン核を有するキノホルム投与患者の膵 B 細胞に退行変性を認めている。これらの報告も、今回のキヌレニン代謝産物のプロインスリン生合体制害作用にキノリン核が重要であることを推定させる 1 つの根拠になると思われる。

ところで、図 1 に示したようにトリプトファン-NAD 代謝におけるキヌレニンは、キナルジン酸や 8-オキシキナルジン酸などを生成する方向への代謝経路と NAD 産生経路との主要な分岐点に位置している。キヌレニン代謝は通常 NAD 生成の方向に進んでいる

が、いくつかの病的条件下ではキナルジン酸や 8-オキシキナルジン酸産生の方向へ偏向していることが知られている。<sup>11-6)</sup> Rose ら<sup>2)</sup>は正常男子にステロイド (ハイドロコチゾン) 投与を行ない、その前後で 5g トリプトファン経口負荷を施行したところ、尿中のキヌレニン、キヌレン酸、キサントレン酸排泄量がステロイド投与後著しく増加することを明らかにした。同じく Rose<sup>3)</sup> は経口避妊薬服用患者にトリプトファン負荷を行ない、尿中 3-オキシキヌレニンおよびキサントレン酸排泄量の増加を認めた。Price ら<sup>4)</sup>も同様の結果を得るとともに、加えてキヌレニン、キヌレン酸、アセチルキヌレニンの尿中排泄量の増加を報告している。また妊婦においてもほぼ同様の成績が報告されている<sup>5)</sup>。さらに、最近岡本ら<sup>6)</sup>は甲状腺機能亢進ラットにおいてキヌレニンやキヌレン酸が尿中に過剰に排泄されていることを示し、そのメカニズムを酵素学的レベルから明らかにした。

しかし、このようなキヌレニン代謝異常の生体における意義について、これまでほとんど明らかにされていない。ただキヌレニン代謝異常と糖代謝異常とが相互に密接な関連性をもっていることを示唆する事実が実験的にも臨床的にもいくつか観察されている。すでに述べたキサントレン酸の催糖尿作用の報告<sup>13)</sup>もその 1 つと考えられる。またキヌレニン代謝産物が尿中に増加しているステロイド投与患者、妊婦あるいは甲状腺機能亢進ラットなどで、しばしば高頻度に糖尿病状態や高インスリン血症の合併することが知られている<sup>7)-10)</sup>。

Bennik ら<sup>30)</sup>は、14 名の妊娠糖尿病人のなかで 13 名にトリプトファン経口負荷後の尿中キサントレン酸排泄量の増加を認め、妊娠による相対的 pyridoxine 欠乏がその原因と考えた。そして pyridoxine 投与により欠乏状態を是正すると、尿中キサントレン酸排泄量が著明に減少すると共に、糖尿病状態が明らかに改善することを示し、キサントレン酸過剰生成が妊娠糖尿を惹起させる可能性があるとの仮説を自ら証明した。

このようにキヌレニン代謝異常がある種の糖代謝異常の 1 つの原因となり得る可能性が推定されていたが、そのメカニズムについては明確にされてはなかった。特にキヌレニン代謝産物がインスリン分泌や生合成にいかなる作用を与えるかについては全く不明であった。

しかし最近岡本ら<sup>15)16)</sup>はラット膵より分離したラ氏島を用いた in vitro の実験で、キヌレニン代謝産物のキヌレン酸、キサントレン酸、キナルジン酸および 8-オキシキナルジン酸が低濃度ブドウ糖存在下でインス

リン分泌促進作用をもつこと、また高濃度ブドウ糖によるインスリン分泌をこれら代謝産物が逆に抑制することを明らかにした。この成績はキヌレニン代謝異常が直接インスリン分泌への影響を介して糖代謝異常に結びつく可能性を示すものであり、彼らは甲状腺機能亢進症、ステロイド投与患者、妊婦、経口避妊薬服用者にしばしば認められる糖尿病状態あるいは高インスリン血症<sup>7-10)</sup>の発生機序の1つにキヌレニン代謝産物の過剰生成が重要な役割を演じているとの仮説を提唱した。

今回の実験結果はキノリン核を有するキヌレニン代謝産物が、インスリン分泌に対する作用のみならず、(プロ)インスリン生成にも影響を与えることを明らかにした。したがって、キヌレニン代謝産物が生体内に過剰に生成される病態では、キヌレニン代謝産物による(プロ)インスリン生成阻害作用とインスリン分泌に対する効果が相俟って、最終的にB細胞内のインスリン含量の減少を来し糖代謝の悪化をもたらす可能性も考えられよう。

一方、糖尿病にトリプトファン(キヌレニン)代謝異常の合併することは、実験的にも臨床的にも多くの報告がある。例えばMcDanielら<sup>31)</sup>はalloxan糖尿病ラットにおいて尿中のN'-methylnicotinamide排泄量の減少とキサンツレン酸排泄量の増加を認めたことから、トリプトファン-NAD経路の3-オキシキヌレニンから3-オキシアントラニル酸への過程に障害があることを示唆した。そしてインスリン投与によりこの異常が是正されることから、糖尿病自体による二次的な現象であろうと推測した。ヒト糖尿病に関しては、Okaら<sup>13)</sup>は糖尿病患者のキヌレニンやキサンツレン酸の尿中排泄量を測定し、正常人にくらべ明らかに増加していることを報告した。また、最近Khatabら<sup>14)</sup>も同様の結果を報告し、しかも糖尿病の重症度と平行してキヌレニン代謝産物の尿中排泄量の増加することを明らかにした。

このように一次性糖尿病においては、多分糖尿病自体が二次的にキヌレニン代謝異常を惹起させる<sup>31)</sup>にしても、このキヌレニン代謝異常が残存する膵B細胞機能をさらに低下させ、糖尿病状態のなお一層の悪化をもたらす、これがまたキヌレニン代謝異常を助長することで悪循環を形成する可能性が考えられる。

最後に、今回の実験結果がキナルジン酸や8-オキシキナルジン酸などキヌレニン代謝産物の薬理作用によるものである可能性を完全に除外することはできない。しかし、経口避妊薬服用者において、経口トリプトファン負荷後8時間の尿中キサンツレン酸排泄量が

1,000~3,600 $\mu$ molにも達することが報告されている<sup>3)</sup>。また正常人のキナルジン酸の1日排泄量は5 $\mu$ mol程度であるが、摂取されたキヌレニン酸の30%に相当する量がキナルジン酸として尿中に排泄されることが知られている<sup>32)</sup>。これまでキナルジン酸や8-オキシキナルジン酸などの血中あるいはラ氏島内濃度に関する報告はないが、すでに述べた種々の病態でインスリンの分泌や生合成に影響を与える程度にまでキヌレニン代謝産物が過剰に生成される可能性を否定できないと思われる。

## 結 論

キヌレニン代謝産物の(プロ)インスリン生成に与える影響を解明する目的で、ラット膵より分離したラ氏島を用いて*in vitro*の実験を行ない、以下の結果を得た。

1. キナルジン酸、8-オキシキナルジン酸、キヌレニン酸およびキサンツレン酸などキノリン核を持つキヌレニン代謝産物は、プロインスリン生成を明らかに阻害した。しかもその阻害作用は他のラ氏島蛋白合成阻害作用にくらべ明らかに選択的であった。

2. プロインスリン生成阻害作用は8-オキシキナルジン酸およびキナルジン酸において最も著明であり、キサンツレン酸やキヌレニン酸がこれに次いだ。L-トリプトファン、L-キヌレニンや3-オキシアントラニル酸にはこの作用を認めなかった。

3. キナルジン酸をはじめとするこれらキヌレニン代謝産物はプロインスリンからインスリンへの転換過程に全く影響を与えなかった。

4. 以上の結果は、以前に報告されたキヌレニン代謝産物のインスリン分泌への影響と考え合わせ、ある種の病態に認められる高インスリン血症あるいは糖尿病状態の成立機序の1つにキヌレニン代謝異常の関与する可能性を推定させた。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師服部信教授に深甚の謝意を表します。また本研究の遂行にあたり、終始御指導、御教示を賜った富山医科薬科大学生化学、岡本宏教授に衷心より謝意を表します。併せて貴重な御助言、御教示を頂いた金沢大学医学部第一生化学・米山良昌教授、同第二生化学・久野滋教授に厚く御礼申し上げます。さらに多大な御協力を頂いた第一内科第一研究室諸君に感謝致します。

## 文 献

- 1) Altman, K. & Greengard, O. : Correlation of kynurenine excretion with liver tryptophan pyrrolase levels in disease and after

hydrocortisone induction. *J. Clin. Invest.*, **45**, 1527-1534(1966).

2) **Rose, D. P. & McGinty, F.:** The influence of adrenocortical hormones and vitamins upon tryptophan metabolism in man. *Clin. Sci.*, **35**, 1-9(1968).

3) **Rose, D. P.:** The influence of oestrogens on tryptophan metabolism in man. *Clin. Sci.*, **31**, 265-272(1966).

4) **Price, J. M., Thornton, M. J. & Mueller, L. M.:** Tryptophan metabolism in women using steroid hormones for ovulation control. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **20**, 452-456(1967).

5) **Rose, D. P. & Braidman, I. P.:** Excretion of tryptophan metabolites as affected by pregnancy, contraceptive steroids, and steroid hormones. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **24**, 673-683(1971).

6) **Okamoto, H., Okada, F. & Hayaishi, O.:** Kynurenine metabolism in hyperthyroidism. *J. Biol. Chem.*, **246**, 7759-7763(1971).

7) **Perley, M. & Kipnis, D. M.:** Effect of glucocorticoid on plasma insulin. *New Engl. J. Med.*, **274**, 1237-1241(1966).

8) **Wynn, V. & Doar, J. W. H.:** Effects of oral contraceptives on carbohydrate metabolism. *J. Clin. Pathol.*, **23**, Suppl. 3, 19(1970).

9) **Spellacy, W. N., Goetz, F. C., Greenberg, B. Z. & Ellis, J.:** Plasma insulin in normal midpregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **92**, 11-15(1965).

10) **Doar, J. W. H., Stamp, T. C. B., Wynn, V., Path, F. C. & Audhya, T. K.:** Effect of oral and intravenous glucose loading in thyrotoxicosis. *Diabetes*, **18**, 633-639(1969).

11) **Kotake, Y. & Inada, T.:** Studies on Xanthurenic acid II. *J. Biochem. (Tokyo)*, **40**, 291-294(1953).

12) **Rosen, D. A., Maengwyn-Davies, G. D., Becker, B., Stone, H. H. & Friedenwald, J. S.:** Xanthurenic acid excretion studies in diabetics with and without retinopathy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, 321-323(1955).

13) **Oka, M. & Leppanen, V. E.:** Metabolism of tryptophan in diabetes mellitus. *Acta Med. Scand.*, **173**, 361-364(1963).

14) **Khattab, M., Abul-Fadl, M., Khalafallah, A. & Hamza, S.:** Studies on the urinary excretion of certain tryptophan metabolites in diabetics. *J. Egypt Med. Assoc.*, **55**, 531-541(1972).

15) **Okamoto, H., Miyamoto, S., Mabuchi, H., Yoneyama, Y. & Takeda, R.:** Insulin-releasing effect of quinaldic acid and its relatives on isolated Langerhans islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1297-1303(1973).

16) **Okamoto, H., Miyamoto, S., Mabuchi, H. & Takeda, R.:** Inhibitory effect of quinaldic acid on glucose-induced insulin release from isolated Langerhans islets of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 623-629(1974).

17) 能登裕・宮元進・馬淵宏・竹田亮祐・岡本宏: キナルジン酸のインスリン分泌に及ぼす影響-ラットを用いた *in vivo* 実験-. *生化学*, **46**, 697(1974).

18) **Lacy, P. E. & Kostianovski, M.:** Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, **16**, 35-39(1967).

19) **Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H. & Takeda, R.:** Inhibition by somatostatin of insulin release from isolated pancreatic islets. *FEBS Letters*, **54**, 103-106(1975).

20) **Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L. & Aten, B.:** Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*, **157**, 697-700(1967).

21) **Patterson, M. S. & Green, R. C.:** Measurement of low energy betaemitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. *Anal. Chem.*, **37**, 854-857(1965).

22) **permutt, M. A. & Kipnis, D. M.:** Insulin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1194-1199(1972).

23) **Davis, B. J.:** Disc electrophoresis. II. method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427(1964).

24) **Steiner, D. F., Kemmler, W., Clark, J. L., Oyer, P. E. & Rubenstein, A. H.:** The biosynthesis of insulin, p175-198. In D. F. Steiner & N. Freinkel (ed.), *Handbook of physiology, section 7, endocrinology. Vol. I.* American Physiological Society, Washington, D.



C., 1972.

25) **Hanson, R. L., Ray, P. D., Walter, P. & Lardy, H. A.** : Mode of action of hypoglycemic agents. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4351-4359(1969).

26) **Quagliariello, E. & Palmieri, F.** : Effects of tryptophan metabolites on enzymes of oxidative phosphorylation. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **24**, 751-763(1971).

27) **Pipeleers, D. G., Marichal, M. & Malaisse, W. J.** : The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIV. Glucose regulation of insular biosynthetic activity. *Endocrinology*, **93**, 1001-1011(1973).

28) **Okamoto, K.** : Experimental studies on the pathogenesis of diabetes mellitus, preliminary report. *Acta Schol. Med. Univ. Kyoto*, **27**, 43-65(1949).

29) 武内忠男・桜間信義・重永孝治 : SMON 剖

検例にみられる膵ラ氏島病変. 医学のあゆみ, **83**, 479-480(1972).

37) **Coelingh-Bennink, H. J. T. & Schreurs, W. H. P.** : Improvement of oral glucose tolerance in gestational diabetes by pyridoxine. *Brit. Med. J.*, **3**, 13-15(1975).

31) **McDaniel, E. G., Hundley, J. M. & Sebrell, W. H.** : Tryptophan-niacin metabolism in alloxan diabetic rats. *J. Nutr.*, **59**, 407-423(1956).

32) **Takahashi, H., Kaihara, M. & Price, J. M.** : The conversion of kynurenic acid to quinaldic acid by human and rats. *J. Biol. Chem.*, **223**, 705-708(1956).

33) 能登裕・伊藤信行・野瀬清・岡本宏 : 分離ランゲルハンス島を用いてのインスリン分泌, 生合成過程の検討. 第49回日本生化学会大会(シンポジウム). 生化学, **48** : 369(1976).

**Inhibition by Kynurenine Metabolites of Proinsulin Biosynthesis in Isolated Pancreatic Islets of the Rat**—Yutaka Noto, Department of Internal Medicine ( I ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Jusen. Med. Soc.*, 89, 177—186 (1980).

**Abstract** The effect of kynurenine metabolites on proinsulin biosynthesis was investigated in isolated pancreatic islets of the rat.

Both quinaldic acid and 8-hydroxyquinaldic acid were found to produce a significant inhibition of proinsulin biosynthesis. Xanthurenic acid and kynurenic acid, though far less effective than quinaldic acid or 8-hydroxyquinaldic acid, also inhibited proinsulin biosynthesis.

However, the conversion process of proinsulin to insulin was not affected by these metabolites. Furthermore, the effect of the kynurenine metabolites was characterized by a preferential inhibition of proinsulin as distinct from non-insulin protein synthesis in the islets.

In contrast to the significant inhibitory effect of these kynurenine metabolites on proinsulin biosynthesis, L-tryptophan, L-kynurenine, 3-hydroxyanthranilic acid and quinolinic acid showed little or no ability to inhibit proinsulin biosynthesis in the islets.

These results, together with the previous data concerning the effect of kynurenine metabolites on insulin release in vitro and in vivo, supported the hypothesis that an excessive formation of some kynurenine metabolites due to a disorder in tryptophan metabolism might be involved in the occurrence ( or pathogenesis ) of a certain diabetic state.